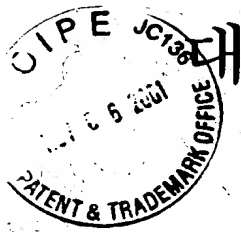


09/930169



Sung-Hoon KIM et al
58333-106



대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 :
Application Number

특허출원 2001년 제 31310 호
PATENT-2001-0031310

출원년월일 :
Date of Application

2001년 06월 05일
JUN 05, 2001

출원인 :
Applicant(s)

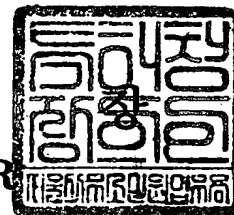
주식회사 이매진
IMAGENE CO., LTD.



2001 년 08 월 02 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.06.05
【발명의 명칭】	p 43의 N-말단 펩타이드를 유효성분으로 하는 면역증강제
【발명의 영문명칭】	Immunological enhancement agent comprising N-terminal peptide of p43 as an effective component
【출원인】	
【명칭】	(주)이매진
【출원인코드】	1-1998-612557-9
【대리인】	
【성명】	김석현
【대리인코드】	9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】	2001-031684-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김성훈
【성명의 영문표기】	KIM, Sunghoon
【주민등록번호】	580710-1068317
【우편번호】	135-280
【주소】	서울특별시 강남구 대치동 삼성아파트 101동 702호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	고영규
【성명의 영문표기】	KO, Young-Gyu
【주민등록번호】	620118-1019629
【우편번호】	420-726
【주소】	경기도 부천시 원미구 중3동 덕유마을 231-407
【국적】	KR
【공지에외적용대상증명서류의 내용】	
【공개형태】	논문발표
【공개일자】	2001.04.05

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 11

【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
김석현 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 3 면 3,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 32,000 원

【감면사유】 소기업 (70%감면)

【감면후 수수료】 9,600 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 신규성(출원시의 특허)규정을 적용받기 위한 증명서류_1통 3. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 면역증강제에 관한 것으로서, 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 하는 면역증강제를 제공한다. 본 발명에 따른 p43의 N-말단 펩타이드들은 우수한 사이토카인(cytokine) 활성을 갖기 때문에 면역반응을 향상시킬 수 있어 면역증강제로 사용될 수 있다.

【대표도】

도 3

【색인어】

p43, 면역증강제

【명세서】

【발명의 명칭】

p 43의 N-말단 펩타이드를 유효성분으로 하는 면역증강제{Immunological enhancement agent comprising N-terminal peptide of p43 as an effective component }

【도면의 간단한 설명】

도 1은 p43과 비교하여 본 발명에서 제조한 p43의 결실 돌연변이 단백질들의 상대적인 위치 및 크기를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에서 제조한 p43 결실 돌연변이 단백질 및 p43 단백질을 정제한 후, SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 정제된 p43 결실 돌연변이 단백질 및 p43 단백질을 인간 단핵구 THP-1 세포(human monocyte THP-1 cells)에 첨가하여 세포를 배양한 후, 발현이 유도된 TNF의 생산량을 나타낸 것이다.

도 4는 정제된 p43 결실 돌연변이 단백질 및 p43 단백질을 인간 단핵구 THP-1 세포에 첨가하여 세포를 배양한 후, 발현이 유도된 IL-8의 생산량을 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<5> 본 발명은 면역증강제에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 면역활성을 갖는 특정 펩타이드를 유효성분으로 하는 면역증강제에 관한 것이다.

<6> 세포고사가 진행되는 세포는 단핵구 유래 대식세포(monocyte-derived macrophage)에 의해 급속히 제거된다. 이러한 현상은 세포고사를 일으키는 세포가 특정 인자들(factors)을 분비하고, 분비된 인자들이 백혈구 및 단핵구(monocyte)에 화학주성(chemotaxis)을 일으키기 때문일 것으로 추정되고 있다. 내피 단핵구 활성화 폴리펩타이드 II(endothelial monocyte-activating polypeptide II, 이하 'EMAPII'라 함)는 세포고사를 일으키는 세포로부터 분비되고, 화학주성을 유발하기 때문에 상기 특정 인자 중의 하나로 알려져 있다.

<7> EMAPII는 전구체인 312개의 아미노산으로 이루어진 p43 단백질의 C-말단 도메인(C-terminal domain)으로서, 세포고사가 일어나는 세포에서 p43의 146번째 아미노산인 아스팔트산(aspartic acid)이 활성화된 카스파제-7(caspase-7)에 의해 절단됨으로써 생성된다(Quevillion, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:32573-32579, 1997; Behrensdoerf, M. A. *et al.*, *FEBS Lett.*, 466:143-147, 2000). 상기 EMAPII의 구조와 성숙(maturation)은 프로인플라메이토리(proinflammatory) 반응에 관여하는 다른 사이토카인(cytokine)인 IL-1 β 의 그것

과 유사한데, 14.5kDa의 IL-1 β 는 33kDa의 비활성 pre-IL-1 β 로부터 ICE(caspase-1)에 의해 절단됨으로써 생성된다.

<8> EMAPII는 프로인플라메이토리 반응을 매개하는 인자로, 단핵성 식세포 (mononuclear phagocyte) 및 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leucocytes)에서 조직 인자(tissue factor), 종양괴사인자(tumor necrosis factor, 이하 'TNF'라 함) 및 인터루킨-8(interleukin-8, 이하 'IL-8'라 함)이 발현되도록 유도한다. 또한, EMAPII mRNA가 고발현되는 조직에서는 대식세포가 축적되는데, 이것은 EMAPII가 죽은 세포로 대식세포를 유인하는 화학주성 물질이라는 것을 의미한다. EMAPII는 사이토카인으로 작용하며, EMAPII N-말단의 15개 아미노산이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Quevillon, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:32573-32579, 1997; Kao, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:9774-7982, 1994; Kao, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:20239-20247, 1992; Kao, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:25106-25119, 1994; Knies, U. E. *et al.*, PNAS USA, 95:12322-12327, 1998). 또한, 미국특허 제 5,641,867호에는 EMAPII의 아르기닌-이소루이신-글라이신-아르기닌-이소루이신-트레오닌 (arginine-isoleucine-glycine-arginine-isoleucine-threonine)을 포함하는 N-말단이 EMAPII의 사이토카인 기능에 중요한 부위임을 밝히고 있다. 최근에 보고된 바에 의하면, 증식하는 내피 세포에서 EMAPII는 정상 세포에는 별다른 부작용을 일으키지 않으면서, 초기(primary) 및 전이(metastatic)된 종양의 성장을 억제하는 것으로 나타났다(Schwarz, M. A. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 190:341-353, 1999).

- <9> 한편, EMAPII의 전구체로 알려진 p43은 광범위하게 발현되는 단백질로 알려져 있다. 상기 p43의 발현 수준은 특히 발생중인 마우스에서 시간 및 공간적으로 매우 다르게 나타나는데, 예를 들면, 생후 8일 내지 16일 된 마우스의 폐에서 p43의 발현이 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 또한, p43은 뇌척수염(encephalomyelitis), 신경염(neuritis) 및 포도막염(uveitis)과 같은 실험상의 자가면역질환 부위(lesion of autoimmune disease)에 있는 미세신경 세포(microglial cell)에서 높은 수준으로 발현된다. 이와 같이, 특정 발생 단계 및 조직에서 p43의 발현 수준이 높게 나타나는 현상은 p43이 염증반응과 세포고사에 관여한다는 것을 암시한다(Tas, M. P. R., and Marray, J. C., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 28:837-841, 1996; Schwarz, M. J. *et al.*, *Glia*, 20:365-372, 1997; Schuesner, H. J. *et al.*, *Glia*, 20:365-372, 1997; Berger, A. C. *et al.*, *J. Immunother.*, 23:519-527, 2000).
- <10> 상기에서 살펴본 바와 같이, p43의 C-말단인 EMAPII 도메인의 사이토카인 활성화에 관한 연구는 광범위하게 진행되어 왔으나, EMAPII의 전구체인 p43 및 p43의 N-말단 기능에 관해서는 연구가 미흡한 상태였다. 이에 본 발명자들은 p43에 관한 연구를 수행하여 PCT 국제특허출원 PCT/KR00/00630호에서 p43과 p43의 C-말단인 EMAPII의 사이토카인 활성을 비교하여, p43이 EMAPII보다 효과적인 사이토카인 및 면역증강제로 작용할 수 있다는 것을 개시한 바 있다.
- <11> 또한, 본 발명자들은 세포고사를 유발시킨 세포와 유발시키지 않은 세포에서 p43 및 EMAPII 단백질의 분비 패턴을 비교한 바 있다. 그 결과, EMAPII 단백질은 정상세포에서 세포가 완전히 파괴된 세포고사 말기에 분비되기 때문에 실제

로 세포 고사의 초기에 작용할 수 없는 반면, p43 단백질은 세포고사에 관계없이 세포밖으로 일정량이 분비되므로 실제의 생리적인 조건에서 작용하는 사이토카인은 EMAPII가 아닌 p43이라는 것을 밝힌 바 있다(Ko YG et al., A cofactor of tRNA synthetase, p43, is secreted to up-regulate proinflammatory genes, . 2001, Apl 5, 276).

<12> 본 발명자들은 p43에 대한 연구를 계속하던 중, p43 단백질의 결실 돌연변이 단백질들의 사이토카인 활성을 측정하여 p43의 N-말단을 포함하는 펩타이드가 우수한 사이토카인 활성을 나타내는 것을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<13> 따라서, 본 발명의 목적은 면역활성이 우수한 p43의 N-말단을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 하는 면역증강제를 제공하는데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

<14> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 하는 면역증강제를 제공한다.

- <15> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <16> 본 발명에 따른 면역증강제의 유효성분인 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드는 p43 단백질의 N-말단 부위로, 구체적으로, p43 단백질의 1 내지 147번의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드, 1 내지 108번의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 및 91 내지 256번의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로 각각 이루어져 있다.
- <17> 본 발명에 따른 면역활성이 우수한 p43의 N-말단을 포함하는 펩타이드들을 얻기 위하여, 구체적으로 본 발명에서는 p43 단백질의 결실 돌연변이를 구축하고, 이러한 돌연변이 단백질들을 정제한 후, 배양 세포에 첨가하여 사이토카인 생성을 유도하는 정도를 측정하였다. 측정 결과, p43 단백질의 여러 가지 결실 돌연변이 중 사이토카인 생성유도율이 우수한 본 발명에 따른 펩타이드들을 분리할 수 있었다.
- <18> 본 명세서에서는 p43 단백질 또는 이의 결실 돌연변이 단백질들을 나타내는데 있어, 편의상 p43 단백질의 아미노산 서열의 시작 번호와 마지막 번호를 괄호 안에 표기하는 것으로 나타내었다. 예를 들어, p43의 91 내지 256번의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 'p43(91-256)'으로 나타내었다.
- <19> 본 발명의 일 실시예에서는 p43인 p43(1-312)와 p43의 C-말단인 p43(148-312) 즉, EMAPII, 그리고, p43의 N-말단 부위를 포함하는 p43(1-147), p43(1-108) 및 p43(91-256)을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 공지의 방법(Park, S. G. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:166673-16676, 1999)에 따라

제조하였다. 상기 유전자 삽입에 사용될 수 있는 벡터로는 특별한 제한은 없으나, pET28a(Novagen)를 사용하는 것이 바람직하다. 이와 같이 제조된 p43 또는 결실 돌연변이 유전자를 포함하는 벡터로 균주를 형질전환시켜, p43 및 결실 돌연변이 단백질들을 발현시킬 수 있다. 상기 형질전환에 사용될 수 있는 균주로는 특별한 제한은 없으나, 대장균을 사용하는 것이 바람직하다.

<20> 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 p43 또는 결실 돌연변이 단백질들의 사이토카인 활성을 조사하였다. 무혈청 배지(serum-free media)에서 배양된 포유류 세포에 상기에서 발현된 단백질들을 첨가하여, 다른 사이토카인의 생성을 얼마나 유도하는지 측정하였다. 상기 포유류 세포로는 성장 인자 의존 세포(growth factor dependent cell)이기만 하면 특별한 제한은 없으나, 인간 단핵구 THP-1 세포를 이용하는 것이 바람직하다. p43 또는 결실 돌연변이 단백질들에 의해 유도될 수 있는 공지의 사이토카인 생성량을 측정함으로써 상기 단백질들의 면역활성 여부를 조사할 수 있으나, 구체적으로 본 발명에서는 사이토카인 중 TNF 및 IL-8의 생성량을 측정하였다. 상기 사이토카인 생성량을 측정하는 방법으로는 당업계에서 공지된 방법을 이용할 수 있으나, 구체적으로 본 발명에서는 ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sandwich Assay)를 사용하였다.

<21> 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드들, p43(1-147), p43(1-108) 및 p43(91-256)은 사이토카인 활성을 나타내며, TNF와 IL-8의 생산을 유도한다. 본 발명에서 확인한 결과, 상기 펩타이드들은 TNF 및 IL-8의 생산량을 EMAPII보다 2-3배 정도 높게 유도하였으며, 특히, 서

열번호 1로 표시되는 펩타이드에 의한 TNF 및 IL-8의 생산량은 p43에 의한 생산량보다 1.1배 정도, EMAPII에 의한 생산량보다 2.5 내지 3배 정도 높았다.

<22> 본 발명에 따른 p43의 N-말단 부위 펩타이드를 유효성분으로 하는 면역증강제는 사람이나 동물에 투여될 수 있는 형태이면 특정한 것으로 제한되지 않지만, 캐리어에 지지된 투여 형태일 수 있다.

<23> 상기 캐리어로는 고체, 반도체, 액상 회석제, 충전제, 다른 제제 보조제 중의 적어도 하나가 0.1 내지 99.5%의 비율로 사용된다. 상기 면역증강제는 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여는 조직내 국부, 피하, 근내, 동맥 또는 정맥내, 그리고 직장 투여일 수 있다. 상기 투여경로에 적합한 투여 형태는 종래의 기술 수단을 사용하여 제조될 수도 있다.

<24> 경구 투여는 고체 또는 액체 단위 투여 형태, 예컨대 벌크 분말제, 분말제, 과립제, 정제, 캡슐제, 시럽 및 현탁제 등을 사용하여 실시될 수 있다. 경구투여의 단위 투여형태는 필요한 경우 마이크로캡슐화될 수 있다. 이러한 제제를 더 코팅하거나 또는 중합체나 왁스에 활성 성분을 함유함으로써, 활성 기간이 연장될 수 있으며 서방성이 얻어질 수 있다.

<25> 상기 면역증강제의 투여량은 환자의 연령, 체중, 투여 경로, 질병, 그의 정도 및 다른 인자를 고려하여 바람직하게 결정될 수 있다.

<26> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

- <27> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명을 한정하는 것은 아니다.
- <28> <실시예 1>
- <29> p43(1-147) 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 제조, 단백질 발현 및 정제
- <30> p43(1-147) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 공지의 방법(Park, S. G. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:16673-16676, 1999)에 따라 다음과 같이 제조하였다. 일본 암연구소(Cancer Institute)의 Kiyotaka Shiba 박사로부터 제공받은 플라스미드 pM338로부터 p43 유전자를 *Nde*I과 *Xho*I으로 절단해낸 후 이를 템플레이트로 사용하고, 서열번호 4 및 5로 각각 표시되는 정방향 및 역방향 프라이머를 이용하여, 95℃ 1분, 58℃ 1분, 72℃ 1분의 조건에서 PCR을 수행하였다. PCR 결과 얻은 산물을 제한효소 *Eco*RI 및 *Sa*I으로 절단한 후, pET28a(Novagen, Madison, USA)에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하였다.
- <31> 상기 p43(1-147) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 대장균 BL21(DE3)을 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균을 LB 배지(Luria Broth; 1g NaCl, 1g Bacto-tryptone, 0.5g yeast extracts) 100ml에 배양시켜, p43(1-147) 유전자를 His-Tag 융합 단백질의 형태로 발현시켰다. 발현된 p43(1-147) 단백질을 공지의 방법(Park, S. G. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:16673-16676, 1999)에 따라 니켈 친화 크로마토그래피(nickel affinity chromatography) 및 모노 Q 또는 S 이온교환 크로마토그래피(Mono Q or S ion-exchange chromatography)로 정제하였다. 염증반응을 유발하는 리포폴리사카라이드를 제거하기 위하여, 정제

된 단백질을 완충용액(10 mM 포타시움 포스페이트(pH 6.0), 100 mM NaCl, pyrogen-free)으로 밤샘 투석하였다. 투석이 완료된 단백질을 상기와 동일한 완충용액으로 평형화시킨 폴리믹신 레진(polymyxin resin, Bio-Rad)에 로딩(loading)하고, 20분 동안 인큐베이션시킨 후 용출시켰다. 잔존하는 리포폴리사카라이드의 농도를 리물러스 아메보사이트 라이세이트 QCL-1000 키트(Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 kit, Bio Whittacker)를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 리포폴리사카라이드의 농도는 염증반응을 유발하지 않는 농도인 20pg/ml 이하로 나타났다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 도 2에 도시된 바와 같이, 21kDa의 분자량을 갖는 p43(1-147) 단백질이 순수하게 분리된 것을 확인할 수 있었다.

<32> <실시예 2>

<33> p43(1-108) 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 제조, 단백질 발현 및 정제

<34> p43(1-108) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 상기 실시예 1에 기술된 방법에 따라 다음과 같이 제조하였다. p43(1-312) 유전자가 삽입된 pET28a(Novagen) 재조합 벡터를 제한효소

AspI 및 *SaII*으로 절단하였다. 절단된 재조합 벡터에 클레노우 단편(klenow fragment)을 처리하여 채워준 다음 다시 재결합시켰다. 다음으로, 리가제(ligase)를 처리하여 상기 벡터를 셀프-라이게이션(self-ligation)시켜 p43(1-108) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하였다. 상기 실시예 1과 동일한 방법에 따라 상기 p43(1-108) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 대장균 BL21을 형질전환시킨 후, 정제하여 SDS-PAGE로 분석하였다. 그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이, 20kDa의 분자량을 갖는 p43(1-108) 단백질이 순수하게 분리된 것을 확인할 수 있었다.

<35> <실시예 3>

<36> p43(91-256) 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 제조, 단백질 발현 및 정제

<37> 서열번호 6 및 7로 각각 표시되는 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하고, PCR의 반응조건을 95℃ 30초, 50℃ 30초, 72℃ 40초로 한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법에 따라 실시하여 p43(91-256) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하고, 상기 재조합 벡터로 대장균 BL21을 형질전환시킨 후, 발현된 단백질을 정제하였다.

<38> 정제된 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 도 2에 도시된 바와 같이, 29kDa의 분자량을 갖는 p43(91-256) 단백질이 순수하게 분리된 것을 확인할 수 있었다

<39> <실시예 4>

<40> 사이토카인 활성 측정

<41> 상기 실시예 1 내지 3에서 정제된 p43 결실 돌연변이 단백질들의 사이토카인 활성을 측정하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

<42> 인간 단핵구 THP-1 세포(human monocyte THP-1 cells) (ATCC에서 구입한 후, 리포폴리사카라이드에 민감하게 반응하는 세포들을 분리하여 배양함)를 10% FBS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신(streptomycin) 및 페니실린(penicillin)이 포함된 RPMI1640 배지에 접종하여, 5% CO_2 , 37°C에서 배양하였다. 혈청(serum)이 포함되어 있지 않은 RPMI1640으로 상기 세포를 2회 세척한 후, 2×10^6 세포/ ml 를 혈청이 포함되어 있지 않은 0.5ml RPMI1640이 분주된 24-웰 플레이트(well plate)에 접종하였다. 2시간 동안 상기와 동일한 조건에서 세포를 배양한 후, 상기 실시예 1 내지 3에서 정제된 단백질을 각각 100nM로 첨가하여 4시간 동안 세포를 자극(stimulation)시켰다. 배양 상층액을 회수한 후, ELISA kit(PharMingen)를 제조사의 권장 방법에 따라 사용하여 TNF 및 IL-8의 농도를 측정하였다. 상기 세포 자극 실험을 2회 반복하여 실시한 후, 그 결과를 각각 도 3 및 도 4에 나타내었다.

<43> <비교예 1>

<44> p43(1-312) 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 제조, 단백질 발현 및 사이토카인 활성 측정

<45> 서열번호 8 및 9로 각각 표시되는 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하고, 템플레이트로 pM338, 제한효소로 *NdeI* 및 *XhoI*을 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일한 방법에 따라 실시하여 p43 단백질을 암호화하는 p43(1-312) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하고, 상기 재조합 벡터로 대장균 BL21을 형질전환시킨 후, 발현된 단백질을 정제하였다.

<46> 정제된 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 도 2에 도시된 바와 같이, 42kDa의 분자량을 갖는 p43(1-312) 단백질이 순수하게 분리된 것을 확인할 수 있었다.

<47> 이후, 정제된 p43(1-312)의 사이토카인 활성을 측정하기 위하여, 상기 실시예 4와 동일한 방법에 따라 실시하여 TNF 및 IL-8의 생산량을 측정하고, 그 결과를 각각 도 3 및 도 4에 나타내었다.

<48> <비교예 2>

<49> p43(148-312) 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 제조, 단백질 발현 및 사이토카인 활성 측정

<50> 서열번호 10 및 11로 각각 표시되는 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하고, 템플레이트로 pM338을 사용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일한 방법에 따라 실시하여 EMAPII를 암호화하는 p43(148-312) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하고, 상기 재조합 벡터로 대장균 BL21을 형질전환시킨 후, 발현된 단백질을 정제하였다.

<51> 정제된 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 도 2에 도시된 바와 같이, 26kDa의 분자량을 갖는 p43(148-312) 단백질이 순수하게 분리된 것을 확인할 수 있었다.

<52> 이후, 정제된 p43(148-312)의 사이토카인 활성을 측정하기 위하여, 상기 실시예 4와 동일한 방법에 따라 실시하여 TNF 및 IL-8의 생산량을 측정하고, 그 결과를 각각 도 3 및 도 4에 나타내었다.

<53> p43(1-312)(p43 단백질)와 p43(148-312)(EMAPII) 및 p43 단백질의 결실 돌연변이 단백질들, 구체적으로 p43(1-147), p43(1-108) 및 p43(91-256)에 의해 유도된 TNF 생산량을 살펴보면, 도 3에 도시된 바와 같이, p43(1-312)일 때 1,500pg/ml, p43(148-312)일 때 500pg/ml, p43(1-147)일 때 1,650pg/ml, p43(1-108)일 때 1,000pg/ml, 그리고 p43(91-256)일 때 2,200pg/ml으로 나타났다. 이로부터, EMAPII인 p43(148-312)보다 p43인 p43(1-312), p43의 N-말단 부위를 포함하는 p43(1-147), p43(1-108) 또는 p43(91-256)에 의해 TNF가 더 많이 생산되는 것을 알 수 있었다.

<54> 또한, 상기 각각의 단백질들에 의해 유도된 IL-8 생산량을 살펴보면, 도 4에 도시된 바와 같이, p43(1-312)일 때 1,495pg/ml, p43(148-312)일 때 650pg/ml, p43(1-147)일 때 1,650pg/ml, p43(1-108)일 때 1,050pg/ml 그리고 p43(91-256)일 때 1,950pg/ml으로 나타났다. 이로부터, EMAPII인 p43(148-312)보다 p43인 p43(1-312), p43의 N-말단 부위를 포함하는 p43(1-147), p43(1-108) 또는 p43(91-256)에 의해 IL-8이 더 많이 생산되는 것을 알 수 있었다.

<55> 상기 결과로부터, p43의 N-말단을 포함하는 p43(1-147), p43(1-108) 또는 p43(91-256)이 EMAPII보다 우수한 사이토카인 활성을 나타내는 것을 알 수 있었으며, 이로부터 p43의 N-말단이 p43의 사이토카인 활성화에 매우 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 p43의 N-말단부위를 포함하는 펩타이드들은 사이토카인 활성이 우수한 면역증강제로 이용될 수 있다.

【발명의 효과】

<56> 상기에서 살펴본 바와 같이, p43의 N-말단부위를 포함하는 p43(1-147), p43(1-108) 또는 p43(91-256)은 사이토카인으로 작용하여 TNF 및 IL-8의 생산량을 증가시킴으로써 면역반응을 향상시킬 수 있으므로 EMAPII보다 우수한 면역증강제로 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 하는 면역증강제.

【청구항 2】

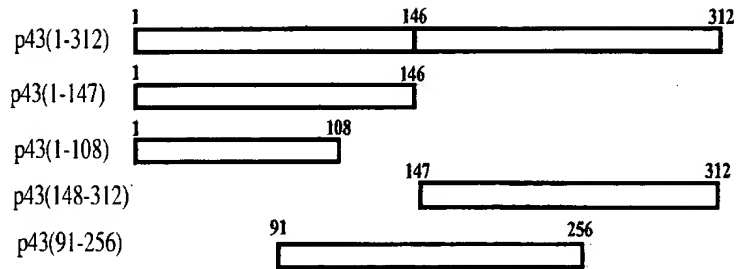
서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 하는 면역증강제.

【청구항 3】

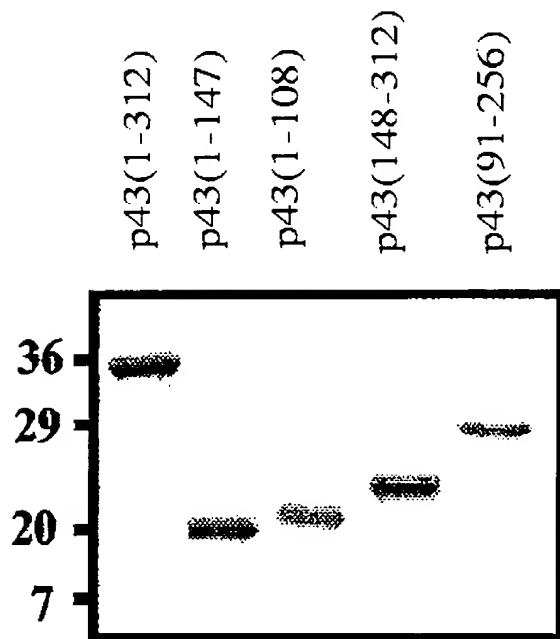
서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 하는 면역증강제.

【도면】

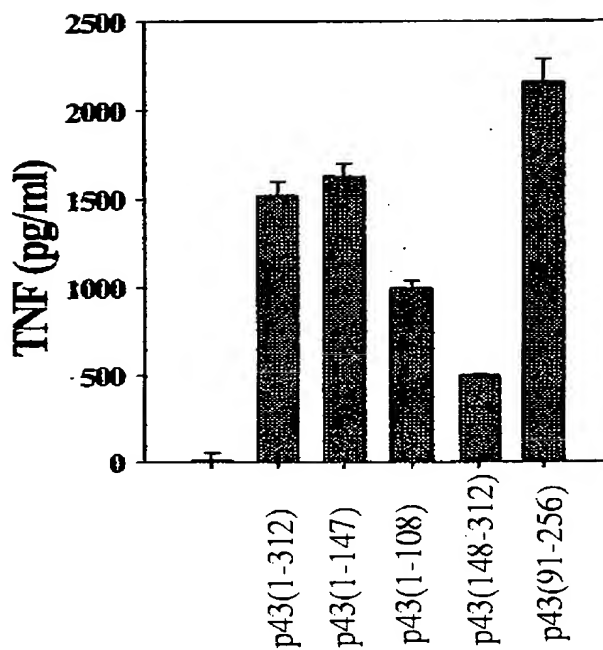
【도 1】



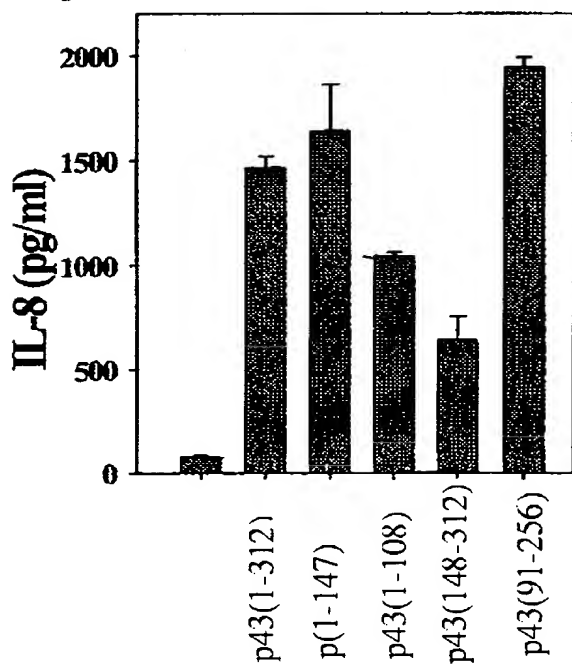
【도 2】



【도 3】



【도 4】



【서열목록】

<110> IMAGENE CO., LTD. <120> Immunological enhancement
agent comprising N-terminal peptide of p43 as an effective component

1020010031310

출력 일자: 2001/8/4

<130> NPF1918 <160> 11 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1 <211> 147 <212> PRT <213>

mammalian <400> 1 Met Ala Asn Asn Asp Ala Val Leu Lys Arg Leu Glu

Gln Lys Gly Ala 1 5 10 15

Glu Ala Asp Gln Ile Ile Glu Tyr Leu Lys Gln Gln Val Ser Leu Leu

20 25 30 Lys Glu Lys Ala Ile Leu Gln Ala

Thr Leu Arg Glu Glu Lys Lys Leu 35 40

45 Arg Val Glu Asn Ala Lys Leu Lys Lys Glu Ile Glu Glu Leu Lys Gln 50

55 60 Glu Leu Ile Gln Ala Glu Ile Gln Asn Gly Val Lys Gln

Ile Ala Phe 65 70 75 80

Pro Ser Gly Thr Pro Leu His Ala Asn Ser Met Val Ser Glu Asn Val

85 90 95 Ile Gln Ser Thr Ala Val Thr Thr

Val Ser Ser Gly Thr Lys Glu Gln 100 105

110 Ile Lys Gly Gly Thr Gly Asp Glu Lys Lys Ala Lys Glu Lys Ile Glu

115 120 125 Lys Lys Gly Glu Lys Lys Glu Lys

Lys Gln Gln Ser Ile Ala Gly Ser 130 135

140 Ala Asp Ser 145 <210> 2 <211> 108 <212>

PRT <213> mammalian <400> 2 Met Ala Asn Asn Asp Ala Val Leu

Lys Arg Leu Glu Gln Lys Gly Ala 1 5 10

15 Glu Ala Asp Gln Ile Ile Glu Tyr Leu Lys Gln Gln Val Ser Leu Leu

20 25 30 Lys Glu Lys Ala Ile Leu Gln Ala

Thr Leu Arg Glu Glu Lys Lys Leu 35 40
 45 Arg Val Glu Asn Ala Lys Leu Lys Lys Glu Ile Glu Glu Leu Lys Gln 50
 55 60 Glu Leu Ile Gln Ala Glu Ile Gln Asn Gly Val Lys Gln
 Ile Ala Phe 65 70 75 80
 Pro Ser Gly Thr Pro Leu His Ala Asn Ser Met Val Ser Glu Asn Val
 85 90 95 Ile Gln Ser Thr Ala Val Thr Thr
 Val Ser Ser Gly 100 105 <210>
 3 <211> 166 <212> PRT <213> mammalian <400>
 3 Met Val Ser Glu Asn Val Ile Gln Ser Thr Ala Val Thr Thr Val Ser 1
 5 10 15 Ser Gly Thr Lys Glu Gln Ile Lys
 Gly Gly Thr Gly Asp Glu Lys Lys 20 25
 30 Ala Lys Glu Lys Ile Glu Lys Lys Gly Glu Lys Lys Glu Lys Lys Gln
 35 40 45 Gln Ser Ile Ala Gly Ser Ala Asp
 Ser Lys Pro Ile Asp Val Ser Arg 50 55
 60 Leu Asp Leu Arg Ile Gly Cys Ile Ile Thr Ala Arg Lys His Pro Asp 65
 70 75 80 Ala Asp Ser Leu Tyr Val Glu Glu
 Val Asp Val Gly Glu Ile Ala Pro 85 90
 95 Arg Thr Val Val Ser Gly Leu Val Asn His Val Pro Leu Glu Gln Met
 100 105 110 Gln Asn Arg Met Val Ile Leu Leu
 Cys Asn Leu Lys Pro Ala Lys Met 115 120
 125 Arg Gly Val Leu Ser Gln Ala Met Val Met Cys Ala Ser Ser Pro Glu 130

135 140 Lys Ile Glu Ile Leu Ala Pro Pro Asn Gly Ser Val Pro
 Gly Asp Arg 145 150 155 160
 Ile Thr Phe Asp Ala Phe 165 <210> 4 <211>;
 27 <212>; DNA <213>; Artificial Sequence <220>;
 <223>; PCR primer <400>; 4 ccggaattca tggcaaataa tgatgct
 27 <210>; 5 <211>; 24 <212>; DNA <213>;
 Artificial Sequence <220>; <223>; PCR primer <400>; 5
 ctggtcgacg tcggcacttc cagc 24
 <210>; 6 <211>; 32 <212>; DNA <213>;
 Artificial Sequence <220>; <223>; PCR primer <400>; 6
 cggaattcat ggtttctgaa aatgtgatac ag 32
 <210>; 7 <211>; 30 <212>; DNA <213>;
 Artificial Sequence <220>; <223>; PCR primer <400>; 7
 ccggtcgact cagaaagcat caaagtaatt 30
 <210>; 8 <211>; 18 <212>; DNA <213>;
 Artificial Sequence <220>; <223>; PCR primer <400>; 8
 catatggcaa ataatgat 18
 <210>; 9 <211>; 18 <212>; DNA <213>;
 Artificial Sequence <220>; <223>; PCR primer <400>; 9
 ctcgagggaa gcatttta 18
 <210>; 10 <211>; 27 <212>; DNA <213>;

1020010031310

출력 일자: 2001/8/4

Artificial Sequence <220> <223>	PCR primer <400>	10
ccggaattct ctaagccaat agatggt		27
<210>	11 <211>	27 <212>
		DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223>	PCR primer <400>	11
ccggtcgact tatttgattc cactggt		27

1020010031310

출력 일자: 2001/8/4

	【서지사항】
【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.06.22
【출원인】	
【명칭】	(주)이매진
【출원인코드】	1-1998-612557-9
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	김석현
【대리인코드】	9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】	2001-031684-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2001-0031310
【출원일자】	2001.06.05
【발명의 명칭】	p 43 의 N-말단 펩타이드를 유효성분으로 하는 면역 증강제
【제출원인】	
【발송번호】	1-5-2001-0027808-60
【발송일자】	2001.06.19
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	첨부서류
【보정방법】	제출
【보정내용】	
【첨부서류】	1. 소기업임을 증명하는 서류_1통
【취지】	특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다. 대리인 김석현 (인)
【수수료】	
【보정료】	0 원
【기타 수수료】	0 원
【합계】	0 원

BEST AVAILABLE COPY

1020010031310

출력 일자: 2001/8/4

【첨부서류】

1. 기타첨부서류_1통[사업자등록증, 임대차계약서, 원천징수이행상황신 고서]